

地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的、疫学的調査解析機能の強化に関する研究 研究協力報告書「アシネトバクター属菌の感染疫学解明に関する研究」

研究分担者 佐多徹太郎（富山県衛生研究所）  
研究協力者 八柳 潤（秋田県健康環境センター）  
研究協力者 鈴木 匡弘（愛知県衛生研究所）  
研究協力者 綿引 正則（富山県衛生研究所）

### 研究要旨

国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学に関する知見を得ることを目的とした。*A. baumannii* の次世代シーケンサーを使用した全ゲノム解析データに基づいた *A. baumannii* International Clone II (IC II) の SNP 系統樹解析と *A. baumannii* の薬剤耐性遺伝子の検索を実施した。SNP 系統樹解析により MDRA が他の *A. baumannii* IC II クラスタに属する株と異なる起源と感染疫学を持つ可能性が示唆された。院内感染防止策構築の基礎となる MDRA の感染疫学に関して、今後さらなる調査が必要である。

### A. 研究目的

アシネトバクター (*Acinetobacter*) 属菌は自然環境中に広く分布し、同じ、非発酵菌である緑膿菌と同様にしばしば院内感染を惹起する。さらに、緑膿菌と異なり湿潤環境のみならず、乾燥状態にも耐えることから、ひとたび病院環境内に定着した場合、その除去は容易ではない。

2008 年秋から 2009 年 1 月に福岡大病院で多剤耐性アシネトバクター (MDRA) の院内感染が発生し、26 人が感染し 4 人が死亡するという院内感染事例が発生し、平成 22 年 2 月には帝京大学医学部附属病院で入院患者 46 名が多剤耐性アシネトバクターに感染し、死亡者が計 27 名となる深刻な健康被害が発生した。このように、国内では多剤耐性アシネトバクターによる、深刻な健康被害を伴う院内感染が既に発生していることから対策を講じる必要があるが、国内におけるア

シネトバクター属菌の感染疫学に関する知見は極めて乏しいことが対策構築上の問題である。

本研究は、国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学に関する知見を得ることを目的として 24 年度から実施した。研究初年度である 24 年度は、秋田県と愛知県の医療機関において分離されたアシネトバクター属菌の菌種同定と薬剤感受性について検討し、*A. baumannii*、*A. pittii*、*A. nosocomialis*、*A. calcoaceticus*、*A. sp.* Close to 13TU の分離頻度が高いことを明らかにした一方、秋田県と愛知県で菌種分布に明瞭な違いがあることを示し、地域に特有の感染疫学が存在している可能性を指摘した。MDRA は確認されなかったものの *A. baumannii* には 5 剤以上の薬剤耐性を獲得した株が認められること、*A. baumannii* 以外のアシネトバクター属菌では比較的薬剤耐性株が少ないこ

とを明らかにした。さらに、MLST 解析により愛知県には耐性傾向が強いといわれる International clone II (IC II)が存在していることも示し、これまで殆ど明らかになっていない国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学の一端を明らかにすることができた。

今年度は次世代シーケンサーを使用した全ゲノム解析データに基づいた *A. baumannii* IC II の系統樹解析を行い、国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学に関する知見を集積した。さらに、次世代シーケンサーを使用して *A. baumannii* の薬剤耐性遺伝子を検索した。

## B. 研究方法

### 1 .全ゲノム解析による系統樹解析と薬剤耐性遺伝子の検索

愛知県で分離された 9 株および秋田県で分離された 8 株の *A. baumannii* IC II を供試し、次世代シーケンサー (Illumina MiSeq) を使用して全ゲノム解析を行った。得られたデータと、感染症研究所で解析した MDRA 3 株のデータ、GenBank に登録された国内外の株のデータを併せて single nucleotide polymorphisms (SNP) による系統樹解析を行った。系統樹解析は MUMmer (Genome Biology, 5:R12, 2004) を用いた SNP 抽出、RAxML (Bioinformatics, btu033, 2014) による系統樹解析、MEGA6 (Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739, 2011) による系統樹描画の手順で行った。また、ResFinder 2.1 (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) により薬剤耐性遺伝子の検索を実施した。

### 2 . 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は KB 法により実施した。供試薬剤はセフトキシム (CTX),

セフトジジム (CAZ), イミペネム (IPM), メロペネム (MEPM), アズトレオナム (AZT), セフェピム (CFPM), ペラシリン (PIPC), アミカシン (AMK), シプロフロキサシン (CPFX), ミノサイクリン (MINO), コリスチン (CL), スルfoisキサゾール (G) とした。

## C. 研究結果

### 全ゲノム解析による系統樹解析と薬剤耐性遺伝子の検索

愛知県で分離された 9 株の *A. baumannii* International Clone II、秋田県で分離された 8 株の *A. baumannii* IC II、感染症研究所で解析した MDRA 3 株、そして国内外で報告されたデータを併せて作成した SNP 系統樹を図 1 に示した。国内で分離された *A. baumannii* IC II は愛知株、秋田株と共に同一のクラスターに分類され、これらが非常に近縁な株であることが明らかとなった。また、秋田県と、愛知県由来株は各県内由来株によるサブクラスターを形成していた。これに対して、感染症研究所で解析した MDRA はこれらとはやや距離が離れたクラスターに分類されることが明らかとなった。一方、海外で分離された株については、系統樹の外周に位置する多様な距離に分類され、国内株とは遺伝的な隔たりが大きいことが示された。

全ゲノム解析に供試した 17 株の *A. baumannii* の KB 法による感受性試験結果 (表 2) と薬剤耐性遺伝子の一覧 (表 3) を示した。全ての分離株が CTX、CAZ、PIPC、CPFX 耐性であった。また、愛知県で分離された 11H01 株は CL を除く 11 剤に耐性を示し、多剤耐性アシネトバクターであった。この株は OXA-23 を保有していた。ResFinder による検索では OXA-51like (OXA-66, OXA-83) も含め

5～14種類の薬剤耐性遺伝子が検出された。アミカシン耐性を示した11株は全て、アミノグリコシド耐性に関与する *armA* 遺伝子を保有し、他にも *aadA1*、*aac(6')Ib* などが見いだされた。*armA* 遺伝子はアミノグリコシドの高度耐性に関与するとされるが、この *methylase* 遺伝子が国内の *A. baumannii* に侵淫していることが示された。

#### D. 考察

SNP 系統樹解析により国内で分離された *A. baumannii* IC II は非常に近縁な株であること、一方、国内で分離された MDRA はこれらとはやや距離が離れたクラスターに属することが示された。このことは、国内に侵淫している *A. baumannii* IC II の中で MDRA が他のクラスターに属する株と異なる起源と感染疫学を持つ可能性を示唆することとして興味を持たれる。

24年度、我々は秋田県と愛知県で分離株の菌種分布に明瞭な違いがあることを示し、アシネトバクター属菌においては地域に特異的な感染疫学が成立している可能性を指摘した。今回 SNP 系統樹解析により秋田県と愛知県の株は非常に近縁であることを示したが、さらに詳しく見ると、秋田県と、愛知県由来株は各県内由来株で小さなサブクラスターを形成していた。この結果は、昨年指摘したアシネトバクター属菌全般についてのみならず、*A. baumannii* IC II についても地域に特異的な感染疫学が成立している可能性を示唆するものとして興味深い。

多剤耐性菌の耐性遺伝子を特定することは、従来、極めて困難であった。今回、我々は次世代シーケンサーによる全ゲノム解析とオンラインサーチサイ

トを併用することにより耐性 *A. baumannii* の耐性遺伝子の検索を試行した。供試した株により5種類から14種類の薬剤耐性遺伝子が特定された。このような耐性遺伝子の検索は、次世代シーケンサーを使用する以前の、従来の方法では実現不可能であった。但し、この方法ではキノロン耐性やマクロライド耐性の機構として重要である標的遺伝子の SNP 変異による耐性機構を特定することはできない。しかしながら、次世代シーケンサーとオンラインサーチサイトを併用して薬剤耐性遺伝子を検索する方法は、薬剤耐性機構の解明に極めて有効であり、他の菌種の薬剤耐性機構の研究にも広く追うよう可能であると考えられる。

アミカシン耐性を示した11株は、アミノグリコシド耐性に関与する *aadA1*、*aac(6')Ib-cr*、*armA* 遺伝子を保有することが示された。これらの遺伝子のうち、*armA* 遺伝子はアミノグリコシドの高度耐性に関与する *methylase* 遺伝子の一種であり、11株のアミノグリコシド耐性機構で重要な役割を果たしているものと推定された。また、秋田県で分離された4株を除き、*sul1* または *sul2* 遺伝子を保有し、スルファメトキサゾールにも耐性を示したことから、Class 1 Integron を保有する可能性が高いものと考えられる。今回解析に供した株の大部分はイミペネム感受性であり、MDRA の報告基準は満たしていない。OXA-23 保有の1株だけがイミペネムにも耐性を獲得しており、OXA-23 を保有した場合イミペネム耐性にはなることが示唆された。

#### E. 結論

次世代シーケンサーによる全ゲノム解析は *A. baumannii* の SNP 解析による分

子疫学解析に有用であるのみならず、従来は困難であった薬剤耐性遺伝子の検索にも極めて有用であることが示されたことから、今後もこの方法を応用してアシネトバクターの耐性機構の解明に取り組む必要がある。

国内においてMDRAは稀であり、侵淫は深刻な状況には至っていないと考えられるが、院内感染防止策構築の基礎となるMDRAの感染疫学に関して、さらなる調査が必要である。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

- 1) 細羽恵理子、鈴木匡弘、国内で分離された *Acinetobacter baumannii* の MLST による系統解析、第 25 回日本臨床微生物学会 (2014 年 2 月) 名古屋市
- 2) 鈴木匡弘、他、国内分離された *Acinetobacter baumannii* international clone II の全ゲノムによる系統解析、第 88 回日本感染症学会 (2014 年 6 月) 福岡市
- 3) 全ゲノム解析による *Acinetobacter baumannii* 分子疫学解析の検討、第 88 回細菌学会 (2015 年 3 月予定) 岐阜市

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図1 全ゲノム SNP による系統樹解析

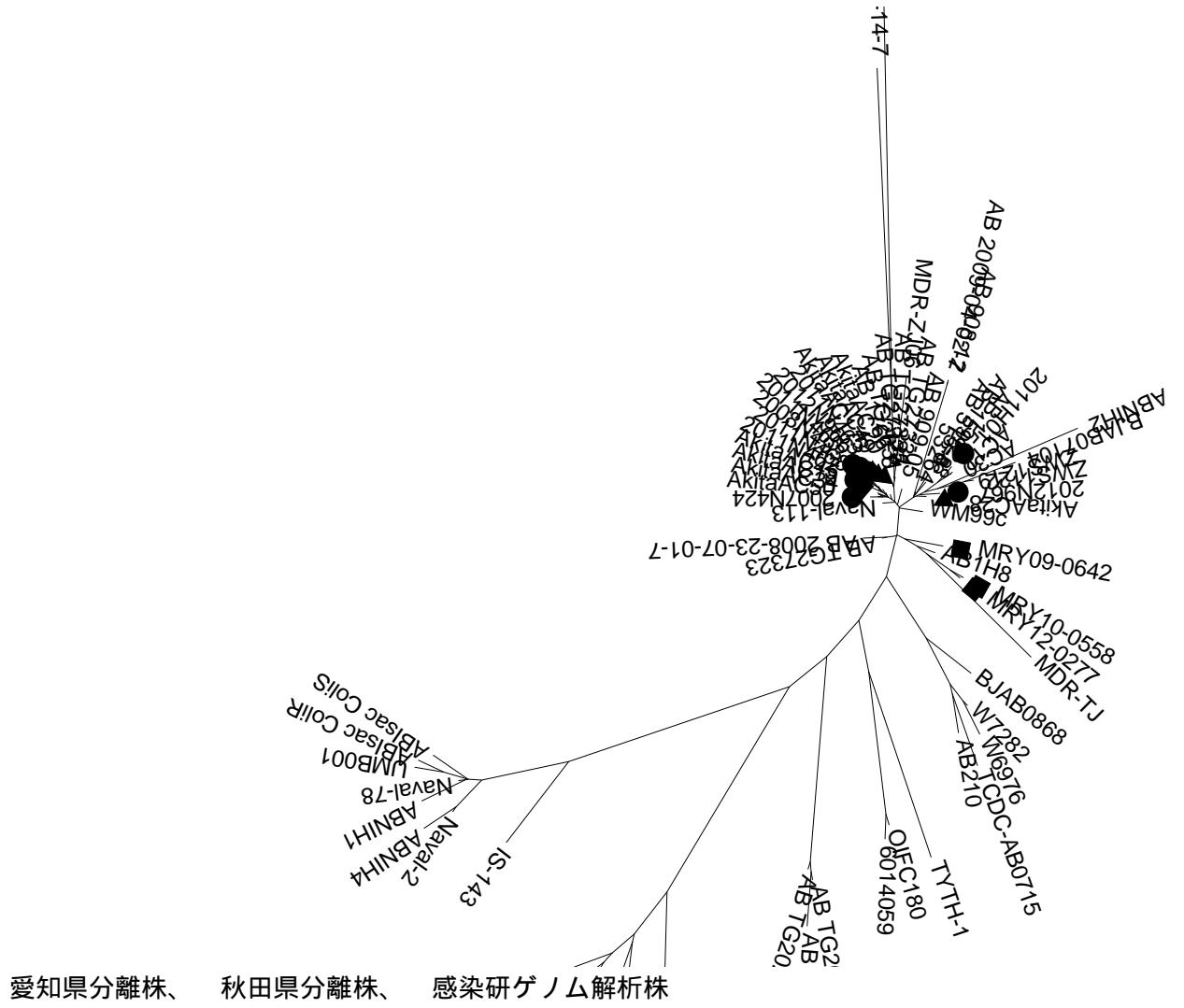


表2 薬剤感受性試験結果(ゲノム解析株)

	CTX	CAZ	IPM	MEPM	AZT	CFPM	PIPC	AMK	CPFX	MINO	CL	G
7N424	R	R	S	S	R	R	R	R	R	I	S	R
8N493	R	R	S	S	R	R	R	S	R	I	S	R
11N462	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R
11N463	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R
11N465	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R
11N468	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R
12N966	R	R	S	S	R	R	R	R	R	NA	S	R
12N967	R	R	S	I	R	R	R	R	R	I	S	R
11H01	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
AC18	R	R	S	S	R	I	R	R	R	S	S	R
AC20	R	R	S	S	I	S	R	R	R	S	S	R
AC28	R	R	S	R	I	S	R	S	R	S	S	R
AC34	R	R	S	S	R	I	R	S	R	S	S	S
AC45	R	R	S	R	R	R	R	S	R	I	S	S
AC49	R	R	S	R	I	I	R	S	R	S	S	S
AC50	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S
AC173	R	R	S	S	R	I	R	R	R	R	S	R

表3 ResFinder によって全ゲノム塩基配列データ中から見つけれられた薬剤耐性遺伝子

	OXA -66	OXA- 83	OXA- 23	ADC- 25	TEM- 1D	<i>aac</i> (6') Ib	<i>aacA4</i>	<i>aph</i> (3')- Ic	<i>aac</i> (3)- Ia	<i>aad</i> A1	<i>strA</i>	<i>strB</i>	<i>armA</i>	<i>mph</i> (E)	<i>msr</i> (E)	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet</i> (B)	<i>catB8</i>
7N424	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
8N493	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
11N462	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11N463	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11N465	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
11N468	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12N966	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
12N967	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
11H01	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
AC18	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
AC20	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
AC28	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
AC34	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
AC45	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-
AC49	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
AC50	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
AC173	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+